

EXATAS E DA TERRA

ESTUDO DAS ATIVIDADES LIPOLÍTICAS DE FUNGOS ISOLADOS DE RIACHOS DA REGIÃO DE FOZ DO IGUAÇU-PR

COLMÁN, Juan Vicente.

Estudante do Curso de Biotecnologia- ILACVN – UNILA;

E-mail: juan.colman@aluno.unila.edu.br;

GONÇALVES, Caroline C. S.

Docente/pesquisador da área de Química – ILACVN – UNILA.

E-mail: caroline.goncalves@unila.edu.br

1 Introdução

A busca por novas enzimas com atividades lipolíticas apresenta-se como uma importante alternativa no estabelecimento de novas tecnologias destinadas a processos industriais sustentáveis. Com uma ampla gama de aplicações biotecnológicas, estas enzimas (responsáveis pelas hidrólises de ésteres e lipídios) apresentam papel biotecnológico fundamental, sendo aplicadas desde a formulação de detergentes e biocombustíveis até sínteses complexas de polímeros e drogas biologicamente ativas [1]. Esta vasta gama de aplicações requer a descoberta de novos biocatalisadores com propriedades biológicas direcionadas, e isto incentiva o estudo dos mais deferentes nichos. Assim, fungos envolvidos em processos de decomposição apresentam-se como ferramentas-chave na busca de novos biocatalisadores, uma vez que estes micro-organismos têm sido associados à uma grande produção de lipases extracelulares [2].

Nesse contexto, este trabalho apresenta um interessante estudo do potencial lipolítico de uma microbiota isolada de detritos vegetais de riachos da região de Foz do Iguaçu – PR aplicando técnicas qualitativas e quantitativas que permitam a investigação do potencial enzimático da microbiota de interesse.

2 Metodologia

Equipamentos, materiais e instrumentação de laboratório, prelavadas e autoclavadas para uma esterilização adequada.

Preparação de meio de cultura (ext. malte e agár base) e cultivo de microorganismos selecionados em placas de Petri. Preservação de amostras pelo método de Castellani (dentro da cabine de segurança biológica), que consiste em cortar cinco cubos de agár do MOs

cultivados anteriormente, em seguida, transferidos para criotubos com 1 a 2 mL de água destilada e mantê-los sob refrigeração a 2-8 ° C.

Teste de Rodamina B: Preparação 50 mL meio de cultura (ext. malte, agár base, rodamina B e azeite de oliva)) e cultivo de microorganismos selecionados em placas de Petri, crescer por 48 hs. Verificação da actividade da lipase (formação de um halo fluorescente) no transiluminador UV. Seleção dos Mos com mais atividade da lipase para a posterior cultura e fermentação em meio sólido.

Fermentação em meio sólido: Preparação do meio de cultura (palha de arroz, tampão de fosfato e o azeite de oliva). Preparação do inóculo com cubos de agár (4 cubos de 7 mm de diâmetro e colocadas a crescer por 72hs. sob agitação constante a 28 ° C e 250 rpm num shaker). Obtenção de extrato enzimático bruto (adicionar 25 ml de tampão fosfato ao material inoculado, manter durante 30 minutos sob agitação constante a 28 ° C e 250 rpm, filtrar através de uma gaze dupla para obtenção de extrato enzimático e guardar na geladeira para armazenamento). Em seguida, realizar o teste de actividade de lipase que consiste em preparar uma mistura de extrato enzimático bruto e um substrato (azeite de oliva e uma solução de goma arábica), para uma incubação durante 30 minutos, sob agitação constante a 60 ° C e 250 rpm, continuamos com a adição de uma mistura de etanol e acetona. Depois fomos para a titulação da mistura obtida com uma solução aquosa de NaOH 0,02 M utilizando fenolftaleína como indicador e fazendo uma comparação posterior com os testes em branco da mesma mistura (ensaios sem agitação).

3 Resultados

Neste trabalho, 33 fungos isolados de detritos vegetais de riachos da região de Foz do Iguaçu – PR tiveram suas atividades lipolíticas investigadas, inicialmente, através de ensaios monitorados por fluorescência. Para tanto, duas sondas fluorogênicas não comerciais e que utilizam a umbeliferona ($\lambda_{\text{ex}} = 370 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$) como sensor (Fig. 1) foram empregadas [3].

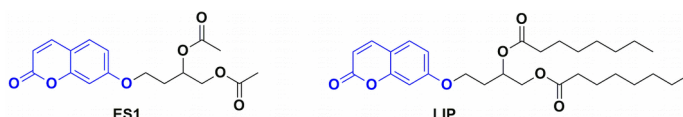


Figura 1. Sondas fluorogênicas empregadas para avaliação do perfil lipolítico dos fungos isolados.

Dentre os fungos avaliados, 30 apresentaram atividade lipolítica frente às sondas avaliadas (% de conversões superiores a 10 % ao final de 72 horas). Os fungos ainda não identificados apresentaram os melhores resultados frente à sonda de cadeia mais longa (LIP),

com percentuais de conversão superiores a 80 % ao final de 72 horas. Tal resultado é um forte indicativo de um potencial lipolítico promissor na microbiota investigada, que pôde ser novamente confirmado através de ensaios com Rodamina-B e azeite de oliva como substrato (Tabela 1). Os testes positivos apresentam um halo laranja fluorescente. As atividades lipolíticas também deverão ser avaliadas por biocatálise convencional, utilizando substratos comerciais.

Tabela 1.

Nº	Cod. do MO	Fotografia do MO
1	M1BNG2	
2	M1BNG1	
3	M1ANG5	

A FES é uma alternativa de baixo custo para o cultivo de MOs, que permite o aproveitamento de resíduos agroindustriais de baixo valor agregado [4]. Estudos preliminares para otimização das condições de cultivo em meio sólido foram realizados utilizando palha de arroz como suporte sólido e peptona como fonte de nitrogênio. Os fungos apresentaram crescimento satisfatório após 96 h (28 °C, 150 rpm e 100% de umidade (m/v)), contudo sob estas condições, ainda não foi possível detectar a atividade lipolítica em ensaios realizados com o bruto enzimático. Os estudos para otimização das condições de FES e extração do bruto enzimático estão em curso em nosso grupo de pesquisas. As atividades lipolíticas também deverão ser avaliadas por biocatálise convencional, utilizando substratos comerciais.

4 Conclusões

Nove fungos isolados de detritos vegetais de riachos (Foz do Iguaçu-Pr) com elevada atividade lipolítica foram selecionados por ensaios com sondas fluorogênicas. As atividades lipolíticas foram confirmadas por ensaios qualitativos com Rodamina-B e azeite de oliva. A otimização de condições de FES e produção de lipases, para posterior aplicação em processos biotecnológicos, encontram-se em curso em nosso grupo de pesquisas.

5 Referências bibliográficas

- Nascimento, R. M. C.; Lima, M. L. S. O.; [Marsaioli, A. J.](#); S., R. C. B.; Gonçalves, C. C. S. Perfil enzimático de fungos isolados de riachos da região de Foz do Iguaçu - PR. 39 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2016, Goiânia.
- Colla, L. M.; Ficanha, A. M. M.; Rizzardi, J.; Bertolin, E.; Reinehr, O.; Costa, J. A. V. *BioMed Res. Int.* **2015**, 1-9.

- Goncalves, C. C. S.; Marsaioli, A. J. *Quim. Nova*, 2014, 37, 1028.
- Sun, S. Y.; Xu, Y. *Process Biochem.* **2008**, 43, 219.